

令和 4 年 11 月 5 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04791

研究課題名(和文) 組織の力学的基盤を司る第三のPCP制御グループを介した新たなPCP調節機構の解明

研究課題名(英文) A novel regulatory mechanism of planar polarity via the third group of PCP factors

研究代表者

山崎 正和 (Yamazaki, Masakazu)

秋田大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40373378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,060,000円

研究成果の概要(和文)：平面内細胞極性(PCP)は、組織平面において細胞集団の向きが特定の方向に揃う現象である。最近研究代表者らはショウジョウバエを用いた大規模解析から、既知のPCP分子とは全く異なる機能を有するPCP制御分子群(Jitterbug(Jbug)グループ)を同定している。本研究では、ライブイメージングの手法などを駆使して、Jbugグループの機能低下によりPCP異常が惹起される機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

平面内細胞極性(PCP)とは、組織平面において細胞や毛などの付属器の向きが特定の方向に揃う現象であり、組織・器官の機能発現に重要な役割を果たす。近年、PCP制御系が、隣細胞の分化や嚢胞腎などに関わることが報告されるとともに、ヒトPCP遺伝子の変異により二分脊椎や僧帽弁逸脱が惹起されることも認知されている。本研究の成果は、組織構築機構の理解のみならず、創薬や医療基盤の創成に資する知見を提供できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Planar cell polarity (PCP) is the collective alignment of polarized cells within the plane of the epithelium. We previously carried out a genome-wide RNAi screen using the *Drosophila notum* and identified novel genes involved in multiple developmental processes including PCP. One PCP gene we identified in the RNAi screen is jitterbug (jbug), which is the *Drosophila* filamin ortholog. However, the molecular mechanism by which Jbug regulates PCP remains unclear. In this study, using fly genetics and live imaging techniques, we elucidated a mechanism underlying PCP defects induced by loss of function of Jbug.

研究分野：発生生物学、細胞生物学

キーワード：平面内細胞極性 PCP ショウジョウバエ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮組織には、細胞の頂端-基底軸と直交する、組織平面の特定の軸に沿った極性が存在する。これは、平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) と呼ばれ、様々な組織・器官において観察される現象である。PCP を示す典型例として、内耳の有毛細胞の向きが挙げられる。全ての内耳有毛細胞は、音の振動を効率よく受容できるように特定の方向に向かって不動毛を形成し、その配向性に異常が生じると、聴覚機能が著しく低下する。同様の現象は気管や卵管に存在する絨毛上皮細胞においてもみられ、絨毛運動の方向性と機能が密接に関連する。

体表面の毛の配向性異常を呈するショウジョウバエ変異体の解析から PCP を司る遺伝子が同定されたのを契機とし、PCP の分子機構の理解が飛躍的に進展した。これまでの研究から、PCP の制御分子は機能的な相違から二つのグループに大別される。一つ目は、7 回膜貫通型タンパク質 Frizzled (Fz) や 4 回膜貫通型タンパク質 Strabismus (Stbm; 別名 Van Gogh)、7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo 等によって構成されるコアグループ分子群である。様々な動物の組織において、これらの分子は非対称に局在することが知られている。例えば、ショウジョウバエ背板の上皮細胞では、Fz は体の後方側に、Stbm は前方側に非対称に局在する。このコアグループ分子群の非対称性を基に、体の後方側に配向する背毛が形成される。

コアグループ分子の非対称局在には、Fz を含む複合体と Stbm を含む複合体間の細胞内および細胞間相互作用が重要であると考えられている。両複合体は、同じ細胞内では排他的に局在するのに対し、細胞間では親和性を示す。換言すると、両複合体が排他的な局在を示す細胞を「磁石」、細胞間相互作用を「N 極と S 極を介した磁石同士の結合」と捉えることもできる。細胞数が少ない場合、上述の細胞内・細胞間相互作用 (磁石の作用) により全ての細胞の向きを同調させることが理論上可能であるが、その向きは特定の方向に定まらない。組織・器官において細胞集団を特定の向きに揃えるためには、その方向を提示する機構が必要であると考えられる。

この制御に深く関与する分子群が、二つ目の PCP 制御グループである Dachshous (Ds) グループである。本グループの構成分子である非典型的カドヘリン Ds は、様々な組織において発現勾配を形成することで組織に方向情報を提供する。すなわち、この方向情報に沿って、コアグループ分子の非対称局在の向き (磁石の方向性) が決定する。これまでに研究代表者らは、実験と数理モデルを駆使して、両グループを繋ぐ分子機構を明らかにしている (Ayukawa et al. Cell Reports, 2014)。

このように、コアグループと Ds グループの協働作用により PCP が形成されると考えられているが、研究代表者らは、ショウジョウバエを用いた大規模スクリーニングと精緻な機能解析から、コアグループおよび Ds グループの構成分子とは全く異なる機能を有する PCP 制御分子群を同定している (Mummery-Widmer et al. Nature, 2009 および未発表)。この分子群は、Jitterbug (Jbug と略; アクチン結合タンパク質 Filamin のショウジョウバエホモログ) を含む 7 つの分子から構成されており、研究代表者らはこの第三の PCP 分子群を Jbug グループと命名した。

2. 研究の目的

ショウジョウバエ背板は上皮細胞と外部感覚器からなる。一部の上皮細胞は腱細胞に分化し、腱細胞から伸張する腱突起が背板の基底側にある間接飛翔筋 (筋肉) に結合する。発生過程において、筋肉は収縮・伸張し、その力は腱突起を介して、背板上皮へと伝播する。

上述した、研究代表者らの遺伝学的解析 (Jbug グループ構成分子の同定) と並行して、米国の Mlodzik 博士のグループから、新規 PCP 分子 Chascon (Chas) が報告された (Olguin et al. Current Biology, 236-242, 2011)。chas 遺伝子を欠損させると、背板上皮の毛の配向性が乱れるが、この異常は筋肉を除去すると救済される。この際、筋肉の収縮性は野生型と同程度であることから、chas 遺伝子欠損による PCP 異常の原因として、外力 (筋肉による牽引) に対する上皮組織の頑強性の低下が考えられる。興味深いことに、Chas は我々の遺伝学的解析において Jbug グループの構成分子として同定されており、この事実は Jbug グループが外力に対する組織の頑健性を調節することで、PCP の制御に関わることを示唆する。これらの知見を基に、研究代表者は、機械的な力が関与する、新たな PCP 調節機構の解明を目指す本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ背板における PCP 遺伝子のノックダウン

ショウジョウバエ背板における PCP 制御遺伝子のノックダウンには、GAL4/UAS システムを使用した。具体的には、ショウジョウバエ背板において特異的に GAL4 を発現する *pannier* (*pnr*)-GAL4 システムと PCP 遺伝子に対する IR (逆向き反復配列) システムとを交配させることで様々な PCP 遺伝子を背板特異的にノックダウンした。IR システムは、国立遺伝学研究所の NIG システムおよび Vienna Drosophila RNAi センターの VDRC システム、Transgenic RNAi Project の TRiP システムを使用した。

(2) ds グループ遺伝子発現の解析

ds グループ遺伝子の発現解析には、ds-lacZ システムおよび *four-jointed* (*fj*)-lacZ システム、ds::GFP

系統 (ds 遺伝子座に in frame で GFP を Knock-in した系統)、抗 Ds 抗体を使用した。

(3) Jbug グループと遺伝学的に相互作用する遺伝子のスクリーニング

Jbug グループ遺伝子を恒常的にノックダウンした遺伝学的背景において、任意の遺伝子をノックダウンし、背毛の配向性の変化を指標に、Jbug グループと遺伝学的に相互作用する遺伝子を探査した。

(4) ショウジョウバエ背板上皮のライブイメージング

E-cadherin::GFP を全身性に発現する系統を用いて細胞境界を蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss 社 LSM780) を使用したライブイメージングにより、ショウジョウバエ背板上皮細胞群の挙動を観察・解析した。

4. 研究成果

(1) Ds グループと外力との関係

Jbug グループ遺伝子ノックダウンによる PCP 異常の分子機構を明らかにするため、Jbug グループ遺伝子をノックダウンした背板における Ds グループ遺伝子の発現を解析した。本解析には、ds または fj 遺伝子のプロモーターの下流で lacZ を発現する系統を使用した。その結果、Jbug グループ遺伝子のノックダウンにより、ds 遺伝子の発現レベルの亢進と発現パターンの異常が観察された。fj 遺伝子の発現には顕著な変化は認められなかった。

次に、Ds タンパク質の発現レベルも同様に亢進しているかどうか明らかにするために、ds 遺伝子座に in frame で GFP を Knock-in した系統 (ds::GFP 系統) と抗 Ds 抗体を使用して解析を行った。その結果、Jbug グループ遺伝子をノックダウンした背板において、Ds タンパク質の発現レベルが微増していることが認められたが、ds 遺伝子の転写レベルの亢進ほど顕著ではなかった。また、Jbug グループ遺伝子をノックダウンすると、一部の細胞集団において Ds タンパク質の非対称局在の向きが異常になるが、詳細な解析の結果、毛の配向性異常を呈する全ての細胞で Ds 局在の異常が起きているわけではないことが明らかとなった。以上の結果から、Ds の発現レベルの亢進や局在異常は、Jbug グループ遺伝子の機能低下による PCP 表現型 (毛の配向性異常) の直接の原因ではないと推察された。

(2) Jbug グループと遺伝学的に相互作用する遺伝子の探索

Jbug グループ遺伝子の機能低下による PCP 表現型の発現機序を理解するために、Jbug グループ遺伝子の機能低下による毛の配向性異常の救済に関わる遺伝子を探査した。その結果、複数の候補遺伝子を同定することができた。現在、これらの因子に着目して、Jbug グループと力との関係を解析している。

(3) ショウジョウバエ背板上皮のライブイメージング

上述の結果から、Ds の発現レベルの亢進や局在異常は、Jbug グループ遺伝子の機能低下による PCP 異常の直接の原因ではないと推察された。そこで、Jbug グループ遺伝子の機能低下による PCP 表現型の原因を明らかにするために、蛹期のショウジョウバエ背板上皮のライブイメージングを実施した。

最初に、様々な条件で撮影を行い、最適な撮影条件を探査した。その結果、背板上皮にダメージを与えることなく、16 時間以上にもおよぶ長時間蛍光ライブイメージングが可能な撮影条件を見出した。

コントロールおよび Jbug グループ遺伝子ノックダウン、Jbug グループ遺伝子とコアグループ遺伝子の二重ノックダウンを含む様々な系統における上皮細胞群の挙動をライブイメージングにて解析したところ、細胞集団の移動方向とは反対の方向に背毛が配向するという興味深い現象を見出した。さらに、力学的な摂動を上皮に与えることで、細胞集団の移動方向を改変すると、背毛の向きも (細胞群の移動方向に対して反対の方向になるように) 変化することが明らかとなった。

以上の解析から、Jbug グループ遺伝子の機能低下により細胞集団の移動方向が異常となること、さらに、細胞集団の移動を介した新たな PCP 制御機構の存在が明らかとなった。今後、この機構を詳細に解析する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) [Tomonori Ayukawa](#), [Masakazu Akiyama](#), [Yasukazu Hozumi](#), [Kenta Ishimoto](#), [Junko Sasaki](#), [Haruki Senoo](#), [Takehiko Sasaki](#) and [Masakazu Yamazaki](#): Tissue flow regulates planar cell polarity independently of the Frizzled core pathway. *Cell Reports* 40, 111388 (2022)

[学会発表] (計 25 件)

- (1) 鮎川友紀, 八月朔日泰和, 山崎正和 長年ベールに包まれた未知の PCP 制御機構に関する研究, 日本解剖学会第 68 回東北・北海道連合支部学術集会, 2022 年 9 月 10 日-11 日, 北海道大学 (口頭発表)
- (2) 山崎正和 コアグループに依存しない PCP 制御機構の解析, 第 19 回生命科学研究会, 2022 年 7 月 1 日-2 日, 日本教育会館 (口頭発表)
- (3) 山崎正和 組織構築の分子遺伝学的研究, 第 44 回日本分子生物学会年会 富澤基金メモリアルイベント, 2021 年 12 月 1 日-3 日, 横浜 (ポスター発表)
- (4) Masakazu Yamazaki: Molecular mechanisms underlying global PCP patterns in Drosophila, Wnt 研究会 2021, 14-15 January, 2021, Web 開催 (口頭発表) (招待講演)
- (5) 鮎川友紀, 秋山正和, 八月朔日泰和, 山崎正和 コアグループに依存しない PCP 制御機構の解析, 第 125 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2020 年 3 月, 誌上開催
- (6) 鮎川友紀, 秋山正和, 八月朔日泰和, 山崎正和 体毛の配向パターンを司る新奇制御機構の解析, 第 42 回日本分子生物学会年会, 2019 年 12 月 3 日-6 日, 福岡 (ワークショップ)
- (7) 鮎川友紀, 秋山正和, 八月朔日泰和, 山崎正和 平面内細胞極性を司る新奇制御機構の解析, 第 92 回日本生化学会大会, 2019 年 9 月 18 日-20 日, パシフィコ横浜 (口頭発表・ポスター発表)
- (8) 鮎川友紀, 秋山正和, 八月朔日泰和, 山崎正和 コアグループに依存しない PCP 制御機構の解析, 日本解剖学会第 65 回東北・北海道連合支部学術集会, 2019 年 9 月 7 日-8 日, 江別 (口頭発表)
- (9) 山崎正和 コアグループに依存しない新奇 PCP 制御機構, 第 18 回生命科学研究会, 2019 年 6 月 28 日-29 日, 東京大学山上会館 (口頭発表)
- (10) 鮎川友紀, 秋山正和, 八月朔日泰和, 山崎正和 コアグループに依存しない PCP 制御機構の解析, 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会 合同年次大会, 2019 年 6 月 24 日-26 日, 神戸国際会議場・神戸国際展示場 (口頭発表・ポスター発表)
- (11) Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Yasukazu Hozumi and Masakazu Yamazaki: A molecular mechanism of the core group-independent PCP pathway, 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Osaka, Japan, 14-17 May 2019 (Oral presentation)
- (12) 山崎正和, 鮎川友紀, 八月朔日泰和, 秋山正和 数理モデルを用いた平面内細胞極性の解析, 第 124 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2019 年 3 月 27 日-29 日, 新潟市 (口頭発表)
- (13) Masakazu Yamazaki: Molecular mechanisms of planar cell polarity, ExCELLS Retreat for Young Scientists 2018, 2019 年 2 月 1-2 日, Mikawa Onsen Kaiyutei (招待講演)
- (14) 山崎正和 平面内細胞極性に関する実験的・数理的研究, 数理科学と生命科学の融合, 2019 年 1 月 17-18 日, 北海道大学 (招待講演)
- (15) 山崎正和, 鮎川友紀, 八月朔日泰和, 秋山正和 数理的アプローチによる平面内細胞極性の解析, 日本解剖学会第 64 回東北・北海道連合支部学術集会, 2018 年 9 月 1 日-2 日, 十和田市 (口頭発表)
- (16) 鮎川友紀, 八月朔日泰和, 山崎正和 平面内細胞極性を司る新規調節機構の解析, 第 123 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018 年 3 月 28 - 30 日, 東京 (ポスター)
- (17) 山崎正和 外力による PCP 制御機構の解析, 第 3 回生体調節研究所 内分泌代謝シンポジウム, 2017 年 11 月 13 日-14 日, 群馬 (招待講演)
- (18) 鮎川友紀, 八月朔日泰和, 山崎正和 平面内細胞極性を司る新規調節機構の解析, 日本解剖学会第 63 回東北・北海道連合支部学術集会, 2017 年 9 月 9 日-10 日, 弘前 (口頭発表)
- (19) 山崎正和 平面内細胞極性の向きが逆転する現象の解析, 第 16 回生命科学研究会, 2017 年 6 月 30 日-7 月 1 日, 金沢 (口頭発表)

- (20) Tomonori Ayukawa, Yasukazu Hozumi and Masakazu Yamazaki: Functional analysis of a PCP regulator Jitterbug, The 4th Asia-Pacific Drosophila Research Conference, Osaka, Japan, 8-11 May 2017 (Poster presentation)
- (21) 鮎川友紀, 山崎正和 平面内細胞極性を司る新規調節機構の解析, 第 122 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017 年 3 月 28 - 30 日, 長崎大学 (長崎) (ポスター)
- (22) 山崎正和, 秋山正和 細胞集団が同じ方向を向く仕組み, CREST 「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」研究領域 第 7 回数理解デザイン道場, 2016 年 12 月 20 日, 日本科学未来館 未来館ホール (招待講演)
- (23) 鮎川友紀, 佐々木雄彦, 山崎正和 平面内細胞極性を司る新規調節機構の解析, 第 39 回 日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 - 12 月 2 日, 横浜 (ポスター)
- (24) 鮎川友紀, 秋山正和, 妹尾春樹, 佐々木雄彦, 山崎正和 平面内細胞極性の分子機構 - 細胞集団が同じ方向に向く仕組み -, 第 28 回高遠・分子細胞生物学シンポジウム, 2016 年 8 月 25-26 日, 高遠さくらホテル (ショートトーク・ポスター発表)
- (25) 山崎正和 平面内細胞極性の分子機構 - 細胞集団が同じ方向に向く仕組み -, 第 115 回 「細胞シグナリング」研究会, 2016 年 6 月 27 日, 横浜市立大学 (招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza.php?koza=kaibo2>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 鮎川 友紀

ローマ字氏名: AYUKAWA Tomonori

所属研究機関名: 秋田大学

部局名: 大学院医学系研究科

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 80586165

研究分担者氏名：秋山 正和

ローマ字氏名：AKIYAMA Masakazu

所属研究機関名：北海道大学

部局名：電子科学研究所

職名：助教

研究者番号（8桁）：10583908

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。